

Andreas Kunzmann, Institut für Polarökologie

## Hämoglobin antarktischer Fische.

### II. Primärstruktur und Hinweise zur Evolution am Beispiel von *Bathyraco marri*.

In den beiden letzten Ausgaben der Mitteilungen zur Kieler Polarforschung wurden physiologische Besonderheiten der antarktischen Fische und der Aufbau sowie die Funktion ihrer Hämoglobine dargestellt. Dabei wurde auf noch laufende Untersuchungen (z.B. Sequenzierung) hingewiesen. Ferner wurde betont, daß im Gegensatz zu früheren Arbeiten an hauptsächlich sub-antarktischen Arten hier a) ausschließlich hochantarktische Fischarten aus dem Weddellmeer untersucht werden und b) Lebensweise und Evolution der jeweiligen Arten bei der Interpretation der blutphysiologischen Daten besonders berücksichtigt werden. Für *Bathyraco marri* (Abb. 1) sind die Untersuchungen mittlerweile abgeschlossen und sollen, beispielhaft für andere antarktische Fischarten mit ähnlicher Lebensweise, im folgenden kurz dargestellt werden.

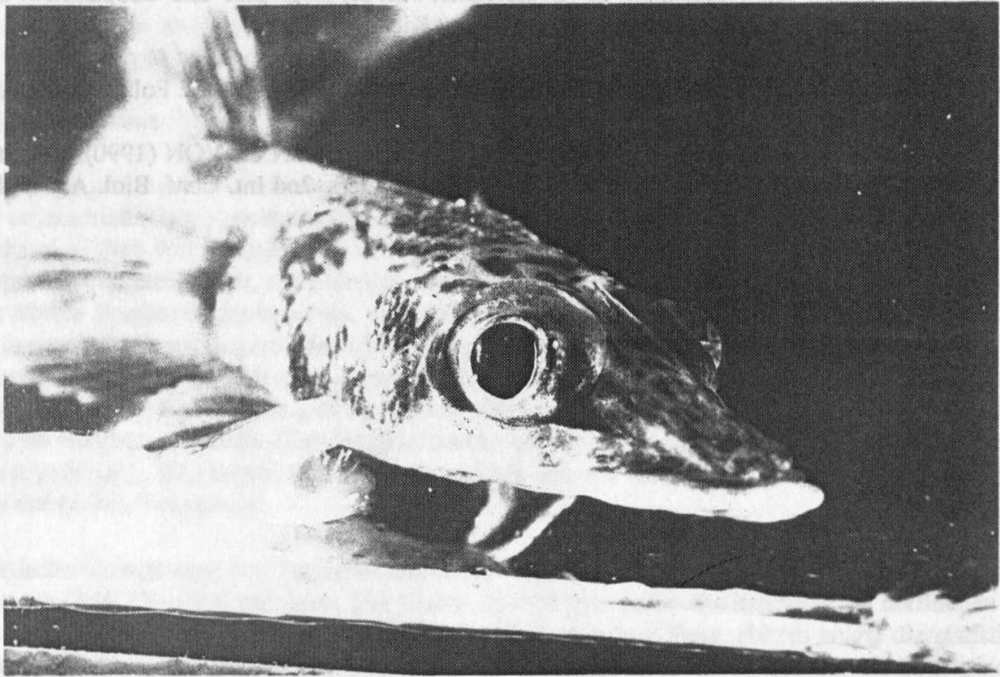


Abb. 1: *Bathyraco marri* Norman. Ein Exemplar wird seit Februar 1988 erfolgreich im Institut für Polarforschung in Bremerhaven gehalten.

Die Familie Bathyracidae, auch Drachenfische genannt, stellt eine der vier antarktischen Familien der Unterordnung Notothenioidei dar und setzt sich aus 18 Arten und 10 Gattungen zusammen (ANDRIASHEV 1965, 1985). Nach DE WITT (1970) und EKAU (1988) bevorzugen sie tieferes (>700 m) und kälteres Wasser. SCHWARZBACH (1988) identifizierte die Bathyraciden mit Hilfe der Clusteranalyse als charakteristisch für den Filchner Graben, ein tiefer Graben unter dem Filchner Eisschelf im südlichen Weddellmeer, dessen Hauptwassermasse das Eisschelfwasser (ISW) ist, mit in-situ Wassertemperaturen bis  $-2.2^{\circ}\text{C}$  und Salinitäten um 34.6 (HELLMER & BERSCH 1985).

Die Untersuchung der Blutparameter Hematocrit (Hct), Erythrocyten (RBC) und Hämoglobingehalt (Hb) ergab bei *B. marri* mit  $\text{Hct} = 14.6\%$ ,  $\text{RBC} = 0.59 \cdot 10^{12}/\text{l}$  und  $\text{Hb} = 29.6 \text{ g/l}$  Werte, die im Vergleich zu anderen notothenioiden Fischen niedrig sind. Hier gelten ein Hct von 17-30, RBC von  $0.6-1.0 \cdot 10^{12}/\text{l}$  und Hb von 30-40 g/l als durchschnittliche Werte (WELLS *et al.* 1980; DI PRISCO *et al.* 1990). Im Vergleich zu Fischen anderer Meeresgebiete sind die Blutparameter aller antarktischer Fische sehr niedrig, was unter anderem die ansonsten erhöhte Blutviskosität in kaltem Wasser in Grenzen hält (MACDONALD *et al.* 1988). Aus den genannten Para-

**Tabelle 1:** Blutparameter von *Bathyraco marri* (aus Kunzmann et al. submitted). MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; MCH = mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt; O<sub>2</sub>-CC= O<sub>2</sub> Gesamtkapazität; P<sub>i</sub>= Partialdruck von O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>; SD= Standardabweichung; n=13.

Parameter	Value	Unit	SD
Hematocrit	14.6	%	2.9
Erythrocytes	0.59	10 <sup>12</sup> *l <sup>-1</sup>	0.12
Hemoglobin	29.6	g*l <sup>-1</sup>	8.6
MCHC	202.7	g*l <sup>-1</sup>	15.8
MCH	50.2	pg	11.2
O <sub>2</sub> -CC blood	4.76	Vol %	1
O <sub>2</sub> -CC cells	27.9	Vol %	3
plasma contrib. to O <sub>2</sub> -CC	16.7	Vol %	3
pH	7.73	1	0.26
P <sub>co2</sub>	3.8	mm Hg	1.9
P <sub>o2</sub>	58.5	mm Hg	9.9

**Tabelle 2:** Vergleich der Blutparameter und Sauerstoffbindungseigenschaften für Arten der Familie Bathyracnidae. / = nicht untersucht (aus Kunzmann et al. submitted).

Species and (reference)	Hct [%]	RBC [10 <sup>12</sup> /l]	Hb [g/l]	Hb comp.	Root	Bohr
<i>V. infuscipinnis</i> (Hureau 1977)	/	0.36	/	/	/	/
<i>P. charcoti</i> (Hureau 1977; di Prisco et al. 1990)	/	0.44	/	1	+	+
<i>P. georgianus</i> (Everson & Ralph 1968)	/	0.21	8	/	/	/
<i>G. acuticeps</i> (Wells et al. 1980; di Prisco et al. 1990)	24	0.78	22.4	1	-	-
<i>C. mawsoni</i> (di Prisco et al. 1990; Kunzmann in prep.)	24.9	0.69	26.4	2	+	+
<i>G. australis</i> (Kunzmann in prep.)	17.1	0.38	28.0	1	+	/
<i>R. glacialis</i> (Kunzmann in prep.)	14.0	0.51	30.0	1	+	/
<i>B. macrolepis</i> (present study)	20.0	0.55	30.0	1	+	+
<i>B. marri</i> (present study)	14.6	0.59	29.6	1	+	+

metern und der Kenntnis der  $O_2$ -Löslichkeit im Plasma (0.8%, GRIGG 1967) kann die Gesamtkapazität des Blutes für  $O_2$  berechnet werden. Für Vollblut von *B. marri* ergibt sich ein Wert von 4.76 Vol%, für die roten Blutzellen allein 27.9 Vol%. Daraus läßt sich berechnen, daß 17 %, also rund 1/6 der Gesamtmenge an  $O_2$  physikalisch gelöst im Plasma transportiert wird. Ein Wert, der erstaunlich hoch ist und bei Fischen gemäßiger und niedriger Breiten nur 5-8% beträgt. Dies zeigt einerseits die große Bedeutung des  $O_2$ -Transports über reine Diffusion für *B. marri* und läßt einen hohen Anteil der Hautatmung an der Gesamtatmung vermuten, ähnlich der Situation bei den hämoglobinlosen Eisfischen. Andererseits läßt sich daraus schließen, daß das  $O_2$ -Transportsystem nicht besonders effizient ist, zumindest was längeranhaltende Höchstleistung angeht. In diesem Zusammenhang sind Videoaufnahmen der Fische vor Ort zu erwähnen, die zeigen, daß ein ausgeprägtes Fluchtverhalten, wie wir es für viele perciforme Fischarten kennen, fehlt. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle Blutparameter von *B. marri*. Die Tabelle 2 zeigt einige Parameter im Vergleich mit anderen Angehörigen der Familie Bathydraconidae.

Untersuchungen zur Struktur beinhalten zunächst einmal die elektrophoretische Analyse (CAE = Celluloseacetatelektrophorese) der Hämolysate. In der Mehrzahl der untersuchten antarktischen Arten finden sich zwei Hämoglobine, wovon eines (Hb 1) 90-95% der Gesamtmenge ausmacht. Dies ist im Vergleich zu Fischen gemäßiger und niedriger Breiten ungewöhnlich. Diese sind dafür bekannt, daß sie multiple Hämoglobine besitzen (bis zu vier z.B. bei der Forelle), welche sich in der Regel hinsichtlich ihrer Funktion voneinander unterscheiden und so eine Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen darstellen (LOVE 1980). Im Gegensatz hierzu besitzt *B. marri* sogar nur ein Hämoglobin (Hb). Der Besitz von nur einem Hb schält sich langsam als Charakteristikum der ganzen Familie Bathydraconidae heraus, wie neuere, teilweise noch unveröffentlichte Arbeiten zeigen (DI PRISCO *et al.* 1990; KUNZMANN & DI PRISCO 1990; KUNZMANN *et al.* unveröffentlicht). Die Fische der Familie Nototheniidae weisen alle, bis auf eine Ausnahme, zwei Hämoglobine auf und die Artedidraco-niden, von denen leider nur sehr wenige Vertreter untersucht sind, scheinen eine Art Zwischenstellung einzunehmen.

Eine SDS-PAGE Elektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel) des *B. marri* Hämolysates ergab zwei Polypeptidketten ( $\alpha$  und  $\beta$  Kette) mit unterschiedlichem Molekulargewicht, beide nahe 16000 Dalton. Die beiden Ketten wurden getrennt und gereinigt mittels Phasenumkehr-HPLC. Eine ausführliche Beschreibung der Methodik findet sich bei D'AVINO & DI PRISCO (1988) und KUNZMANN *et al.* (unveröffentlicht). Die anschließende Sequenzierung nach dem Prinzip des Edman Abbaus von Aminosäuren (AS) auf einem Autoanalyzer lieferte die genaue Abfolge der AS bei beiden Ketten. Das exakte Molekulargewicht (MG) der  $\alpha$ -Kette mit 142 AS beträgt 15552 Dalton und das der  $\beta$ -Kette mit 146 AS 16048 Dalton, womit sich das Gesamt MG des Hämoglobins mit 63200 Dalton errechnet. Ein Vergleich der Sequenz mit der anderer antarktischer Fischarten zeigt eine hohe Übereinstimmung von bis zu 90%, auch wenn die verglichenen Arten unterschiedlichen Familien angehören. Zieht man Fischarten aus gemäßigten oder niederen Breiten heran, ergibt sich immerhin noch eine Übereinstimmung in ca. 50-70% der Aminosäuren, obwohl die verglichenen Arten unter völlig verschiedenen Umweltbedingungen leben und systematisch weit voneinander entfernt sind (Tabelle 3). Die hohe Sequenzidentität innerhalb der antarktischen Fische spiegelt den gemeinsamen Ursprung wider, die deutlich geringere Identität mit den nichtantarktischen Fischen, bei gleicher Funktionsweise des Proteins, ist ein Hinweis auf den hohen Evolutionsdruck südlich der antarktischen Konvergenz.

Tabelle 3: Sequenzidentität (%) der  $\alpha$  und  $\beta$  Kette von Fischhämoglobinen antarktischer\* und nichtantarktischer Fische im Vergleich (aus Kunzmann *et al.* submitted).

SPECIES	<i>T. thynnus</i>	<i>C. carpio</i>	<i>S. irideus</i>	<i>B. marri</i>	<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb2
<b><math>\alpha</math>-chains</b>					
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb1'	73	59	57	84	63
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb2'	58	63	53	71	/
<i>B. marri</i> '	79	65	53	/	/
<i>S. irideus</i> HbIV	50	63	/	/	/
<i>C. carpio</i>	56	/	/	/	/
<b><math>\beta</math>-chains</b>					
<i>N. coriiceps neglecta</i> Hb1,2'	56	57	63	90	/
<i>B. marri</i> '	56	57	61	/	/
<i>S. irideus</i>	51	73	/	/	/
<i>C. carpio</i>	50	/	/	/	/

Bei den Bathydraconiden läßt sich der Besitz von nur einem Hämoglobin mit konstanten Umweltbedingungen hinsichtlich des O<sub>2</sub>-Gehaltes erklären. Wie schon erwähnt, gelten sie als charakteristisch für das Gebiet des Filchnergrabens, dessen Wassermasse (kaltes Eisschelfwasser) konstant über reichlich O<sub>2</sub> verfügt. Diese Anpassung an den abiotischen Faktor O<sub>2</sub> wird überlagert von dem im letzten Beitrag erwähnten evolutiven Prozeß der Reduktion bei allen antarktischen Fischen. Die Notothenioiden stammen primär von benthischen, barschartigen Vorläufern (mit multiplen Hb's) ab. Eine Verminderung von Hämotokrit, Erythrocyten und Hämoglobingehalt ist bei allen Notothenioiden zu beobachten. Die Channichthyiden (Eisfische) stellen möglicherweise den Höhepunkt dieser Entwicklung dar. Eine systematische Einordnung auf Grund von anatomischen Merkmalen gruppiert die Bathydraconiden an die Spitze der rotblütigen Arten (IWAMI 1985), also als letzte Stufe vor den Eisfischen. Dies erklärt die niedrigen Werte für die Blutparameter und der Besitz von nur einem Hämoglobin. Die Richtigkeit dieser Hypothese wird zur Zeit an weiteren Vertretern der Bathydraconiden mit ähnlicher Lebensweise getestet.

### Literatur

- ANDRIASHEV, A.P. 1965 A general review of the Antarctic fish fauna. Monogr. Biol. 25: 491-550.
- ANDRIASHEV, A.P. 1985 A general review of the Antarctic fish fauna. Proc. V Congr. europ. Ichtyol. Stockholm, pp 357-372.
- D'AVINO, R.; DI PRISCO, G. 1988 Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties. I Molecular structure. Comp. Biochem. Physiol. 90 B(3):579 - 584.
- DE WITT, H. H. 1970 The character of the midwater fish fauna of the Ross sea, Antarctica. In: HOLDGATE (ed.) Antarctic Ecology, Vol 1: pp 305-314, Academic Press, London.
- DI PRISCO, G.; GIARDINA, B.; D'AVINO, R.; CONDO, S.G.; BELLELLI, A.; BRUNORI, M. 1988 Antarctic fish hemoglobin : an outline of the molecular structure and oxygen binding properties. II. Oxygen binding properties. Comp. Biochem. Physiol. 90B(3):585-591.
- DI PRISCO, G.; D'AVINO, R.; CAMARDELLA, L.; CARUSO, C.; ROMANO, M.; RUTGLIANO, B. 1990 Structure and function of hemoglobin in Antarctic fishes and evolutionary implications. Polar Biol. 10:269-274.
- EKAU, W. 1988 Ökomorphologie nototheniider Fische aus dem Weddellmeer, Antarktis. Ber. Polarforsch. 51:1-140.
- EVERSON, I.; RALPH, R. 1968 Blood analyses of some Antarctic fish. Br. Antarct. Surv. Bull. 15:59-62.
- GRIGG, G.C. 1967 Some respiratory properties of the blood of four species of Antarctic fishes. Comp. Biochem. Physiol. 23:139-148.
- HELLMER, H.H.; BERSCH, M. 1985 The Southern Ocean. Rep. Polar Res. 26:1-115.
- HUREAU, J.C.; PETIT, D.; FINE, J.M.; MARNEUX, M. 1977 New cytological, biochemical, and physiological data on the colorless blood of the Channichthyidae (Pisces, Teleosteans, Perciformes). in: LLANO, GA. (ed.): Adaptations within Antarctic ecosystems Gulf Publ. Co, Houston, pp. 459-477.
- IWAMI, T. 1985 Osteology and relationships of the family Channichthyidae. Mem. Natl. Inst. Polar. Res. Ser. E No.36:1-69.
- KUNZMANN, A.; CARUSO, C.; DI PRISCO, G. Hematological studies on a high-Antarctic fish: *Bathydraco marri* Norman. (submitted)



KUNZMANN, A.; DI PRISCO, G. 1990 On the blood physiology of Weddell Sea fishes. 2nd Int. Conf. Biol. Ant. Fishes, Ravello 30.5-1.6.90.

LOVE, R.M. 1980 The chemical biology of fishes. Vol 2, Advances 1968-77. AP, L, NY, Toronto, Sydney, San Fr., pp. 943.

MACDONALD, J.A.; MONTGOMERY, J.C.; WELLS, R.M.G. 1987 Comparative physiology of Antarctic fishes. *Advances in Marine Biology* 24:321-388.

SCHWARZBACH, W. 1988 The demersal fish fauna of the eastern and southern Weddell Sea: geographical distribution, feeding of fishes and their trophic position in the food web. *Reports on Polar Research* 54:3-94.

WELLS, R.M.; ASHBY, M.D.; DUNCAN, S.J.; MACDONALD, J.A. 1980 Comparative study of the erythrocytes and hemoglobins in notothenoid fishes from Antarctica. *J. Fish Biol.* 17(5): 517-527.